

氏 名	伊 藤 誉
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 559 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	腸管虚血再灌流障害に続発する肺障害におけるインフラマソームの役割の解明
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 布 宮 伸 (委 員) 教 授 水 田 耕 一 講 師 眞 田 幸 弘

論文内容の要旨

1 研究目的

腸管虚血再灌流障害は、急性腸間膜虚血症や出血性ショック、絞扼性イレウス、小腸移植など様々な原因によって引き起こされる。この病態には、炎症性サイトカイン、好中球浸潤による組織障害、活性酸素種、虚血腸管から放出された腸内細菌由来のエンドトキシンなどが主要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細な分子機構は不明であり、有効な治療法も確立されていない。また、腸管虚血再灌流障害は、続発する遠隔多臓器障害をきたすことも知られている。近年、新たな炎症惹起経路の一つとしてインフラマソームと呼ばれる細胞質内の蛋白複合体が注目されている。NLRP3 インフラマソームはアダプター分子 ASC を中心とし、パターン認識受容体である NLRP3 と Caspase-1 から構成される。インフラマソームが形成されると、Caspase-1 の活性化を介して IL-1 β の前駆体が切断され、成熟型へと変換されることで周囲の組織に炎症反応を引き起こす。これまで、心臓、肝臓、腎臓の虚血再灌流障害においても、NLRP3 インフラマソームが炎症惹起に深く関与していることが報告されているが、腸管虚血再灌流障害における役割は不明である。本研究では、腸管虚血再灌流障害及び続発する遠隔臓器障害に NLRP3 インフラマソームが関与するという仮説をたて検討を行った。

2 研究方法

In vivo 実験では野生型 (Wild-type: WT) マウスを用いて新規腸管虚血再灌流モデルを作成し、インフラマソーム関連分子欠損マウス（主として NLRP3 欠損マウス）を用いて、虚血 1 時間再灌流 4 時間後に腸管組織、血清、12 時間後に遠隔臓器（心・肺・肝・腎）のサンプリングを行った。炎症性サイトカイン、血清 LDH 及び肝腎機能、腸管及び肺の組織学的検討、遺伝子発現、蛋白発現解析、肺の血管透過性亢進の評価を行った。さらに、好中球除去、骨髄移植を行い骨髄由来細胞の役割を検討した。

In vitro 実験では WT、NLRP3 欠損マウスから初代肺血管内皮細胞を単離・培養し、血管内皮細胞がインフラマソーム機構を持ち、IL-1 β を産生するかどうかを検討した。骨髄移植と In vitro 実験の結果より、病態における肺血管内皮細胞の重要性が示されたため、再灌流直後の門脈血中から LC/MS を用いて抽出した 3 種類のメディエーターを、肺血管内皮細胞に添加し、インフラマソ

ームの活性化に対する役割を検討した。さらに、腸管虚血症患者の術前血清を用いて、それらの3つのメディエーターの濃度を測定した。

3 研究成果

NLRP3、ASC、Caspase-1/11、IL-1 β の欠損により、腸管虚血再灌流後の生存期間は延長し、病態におけるNLRP3インフラマソーム依存的なIL-1 β の重要性が示された。しかし、NLRP3欠損では腸管の炎症は軽減されず、血清中の炎症性サイトカイン濃度も差は認めなかったことから、腸管虚血再灌流に続発する遠隔臓器障害が生存に寄与する可能性を考えた。遠隔臓器（心・肺・肝・腎）障害の評価では、腸管虚血再灌流は続発する遠隔多臓器障害を引き起こし、NLRP3欠損マウスにおいて肺障害のみが顕著に抑制されていたことから、生存率の差は肺障害の差であることが判明した。肺では、NLRP3欠損により炎症、酸化ストレス、血管透過性の亢進が劇的に抑制されていた。病態における骨髓由来細胞の役割を検討するために、好中球除去や骨髓移植を行いそれらの役割を確認したところ、好中球除去により肺障害は軽減されず、骨髓由来細胞よりも非骨髓由来細胞が重要な役割を果たしているという結果であった。

続発性肺障害における血管透過性の亢進は、血管内皮細胞障害が主因であるため、肺血管内皮細胞におけるNLRP3発現に注目した。腸管虚血再灌流後に、肺からCD45陰性CD31陽性の血管内皮細胞を単離し、NLRP3が蛋白レベルで発現していることを確認した。さらに、これらの肺血管内皮細胞がNLRP3インフラマソーム活性化の機構を持ち、IL-1 β を産生することを明らかにした。

腸管-肺の臓器連関を繋ぐメディエーターを検索するために、腸管虚血再灌流直後の門脈血を用いてLC/MS解析を行い、アラキドン酸、リノール酸由来の脂質メディエーターを同定した。その中から12-HETE、11-HETE、13-HODEを抽出し、これらの脂質メディエーターが、肺血管内皮細胞においてNLRP3インフラマソームの活性化を増強することを明らかにした。さらに腸管虚血性患者の術前の血清においても、これらの脂質メディエーターの血中濃度が上昇していた。

以上の結果より、肺血管内皮細胞におけるNLRP3インフラマソームは、腸管虚血再灌流に続発する肺障害において重要な役割を果たしていること、虚血再灌流に由来する脂質メディエーターがインフラマソームの活性を増強することが示された。

4 考察

これまで動物モデルの再現性の乏しさなどが原因で、腸管虚血再灌流障害におけるNLRP3インフラマソームの役割は検討されていなかった。本研究は、再現性の高い新規動物モデルを作成し、腸管虚血再灌流に続発する肺障害において、NLRP3インフラマソームは病態の本質に関わる重要な役割を果たすことを明らかにした最初の報告である。また虚血再灌流直後の門脈血より3種類の脂質メディエーターを同定し、インフラマソームの活性化を増強することも明らかにした。しかし、腸管虚血再灌流刺激によるIL-1 β 前駆体産生のプライミングシグナルは不明であり、脂質メディエーターがインフラマソームを活性化するメカニズム、インフラマソームNon-canonical経路のCaspase-11との関連などは十分検討できておらず、今後の検証が必要である。

5 結論

本研究では、腸管虚血再灌流障害の病態において肺血管内皮細胞における NLRP3 インフラマソームの活性化が重要な役割を果たしていること、腸管虚血再灌流に由来する 12-HETE、11-HETE、13-HODE などの脂質メディエーターが肺血管内皮における NLRP3 インフラマソームの活性化を増強することを明らかにした。本研究の結果より、腸管虚血再灌流に続発する肺障害に対する NLRP3 インフラマソーム依存的な IL-1 β を標的とした治療の可能性を示すことができた。

論文審査の結果の要旨

本論文のエッセンスは、以下の通りである。

- 1) 再現性が高く、より実臨床に近い腸管虚血再灌流動物モデルを作成した
- 2) 腸管虚血再灌流に続発する肺傷害の病態にインフラマソーム依存性の IL-1 β が関与し、これは腸管虚血再灌流によって誘導された脂質メディエーターが促進する可能性がある
- 3) 腸管虚血再灌流に起因する、いわゆる続発性（間接的）急性肺傷害における炎症反応の初期応答の主座は血管内皮細胞である

本研究は、方法論において極めて高い新規性を有し、得られた結果も論理的に構成されており、将来的な急性肺傷害治療薬にも繋がる可能性がある、有意義な研究であると判断する。

加筆修正すべき点として、研究協力者の所属を明らかにすることと、研究結果のまとめを最終章に追加することが指摘された。

以上の指摘を受け、論文の修正が適切に行われたことを確認、医学博士学位論文に値するものと判断した。

最終試験の結果の要旨

本研究は、1) 再現性が高く、より実臨床に近い腸管虚血再灌流動物モデルを作成し、2) 腸管虚血再灌流に続発する肺傷害の病態にインフラマソーム依存性の IL-1 β が関与し、これは腸管虚血再灌流によって誘導された脂質メディエーターが促進する可能性があり、3) 腸管虚血再灌流に起因する、いわゆる続発性（間接的）急性肺傷害における炎症反応の初期応答の主座は血管内皮細胞であることなどを明らかにした、極めて有意義なものであると判断した。

申請者の研究内容の発表は、具体的かつ論理的であり、審査員からの質問に対しても真摯に対応し、適切な回答が行われたと評価したことから、審査員一同、申請者は医学博士としての資格に達していると判定した。